

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12307

研究課題名（和文）水素を高生産する嫌気性細菌のゲノム編集によるバイオリファインリーへの応用

研究課題名（英文）Application of gene editing by Clostron technology for biorefinery by hydrogen producing Clostridium

研究代表者

木村 哲哉（Kimura, Tetsuya）

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：00281080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：バイオマスであるキチンを分解し水素ガスを高生産するClostridium paraputrificumについて水素生産に関わる重要なステップとなるピルビン酸からアセチルCoAを生じる経路をバイパスする経路となるピルビン酸リアーゼの活性化酵素遺伝子をClostron法によるゲノム編集技術で遺伝子破壊したところ、グルコースを炭素源とする培地では水素ガスの生産が増加した。また、酪酸の生産経路を破壊することで、エタノールの生産が増加する傾向が得られた。さらに、セルロースを分解するRuminiclostridium josuiについて高発現ベクターの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球温暖化による気候変動は人類が直面する重大な課題であり世界的に注目が集まっている。必要なエネルギーの多くを輸入化石燃料に頼っている我が国にとって、バイオマスを有効利用することは重要である。本研究で対象とする嫌気性細菌は、キチンやセルロースを分解して水素ガスやアルコールを生産する。本研究では、キチンを分解する細菌の遺伝子編集技術を利用して、代謝経路を改変することで水素ガス生産やアルコール生産の向上を行った。本研究で扱う嫌気性細菌は、研究室で単離した固有の細菌であり、我が国独自の技術としてオリジナリティーが高い。

研究成果の概要（英文）：C. paraputrificum decomposes chitin and produces hydrogen gas and ethanol. Pathway from pyruvate to acetyl-CoA is a critical step for hydrogen gas production. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFO) catalyzes this important step. However, Pyruvate formate lyase (PFL), which converts pyruvate to formate and acetyl-CoA, bypasses the PFO pathway. Therefore, we attempted to stop PFL pathway and to concentrate metabolic flow from pyruvate to acetyl-CoA in PFO pathway. The PFL gene and the PFL activase (PFLA) gene were encoded in polycistronic and we tried to disrupt PFL and PFLA gene. Only the PFLA gene was disrupted by the genome editing Clostron method. The production of hydrogen gas increased in glucose as a carbon source. In addition, we succeeded in disrupting the production pathway of butyric acid and the strain increased the ethanol production. Furthermore, we have succeeded in developing a high-expression vector for cellulolytic bacterium R. josui.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Clostridium biomass hydrogen gas pyruvate acetyl-CoA ethanol chitin

1. 研究開始当初の背景

水素による真のゼロエミッションを実現するには国内の自然エネルギーを使って水素を作ることが必要になる。自然エネルギーからの水素生産には、太陽光や風力、水力などから電気を起こす方法と、植物が太陽エネルギーを単糖類のポリマーとして多量に蓄積したバイオマスからの生産が考えられる。バイオマスのなかでも食料と競合しないセルロースや、甲殻類などのキチンから水素を生産できれば循環型水素社会に近づく。

嫌気性細菌によるアセトン・ブタノール発酵は第二次大戦中に日本でも研究がなされたが、石油産業が発展したため忘れられていた。しかし近年、SDGsの達成が国際的な取り組みとなって以降、アジア諸国を中心に再び注目され研究競争は加速している。我が国では、嫌気性細菌による発酵は長年の研究実績があり、燃料生産のみならずバイオリファイナリーを目指すには有利な位置にいると考えられるが、嫌気性菌の基礎代謝経路 (Fig. 1) は、教科書的な好気性細菌の経路とは異なるユニークなものが多く、生物の進化・多様性という学術面でも意義があることから、基礎的な解明も重要である。応用的にもこれら経路を近年発達している様々なゲノム編集の技術をもって改変することで代謝の流れを自在に変化させ、水素やアルコールなど有用な産物の生産比率を自在に変える技術も必要となる。

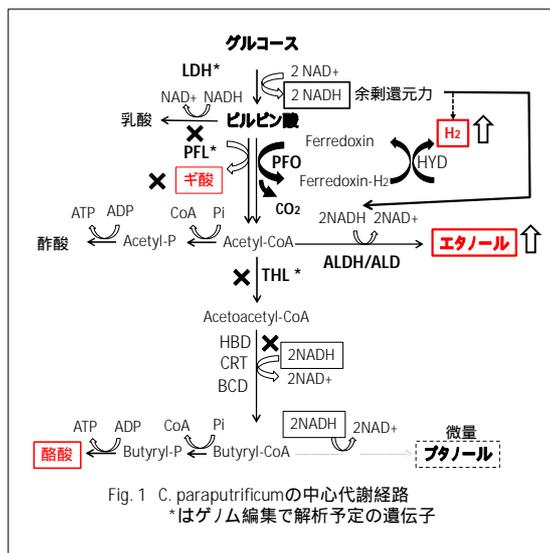


Fig. 1 *C. paraputrificum*の中心代謝経路
*はゲノム編集で解析予定の遺伝子

2. 研究の目的

バイオマスを効率的に分解する嫌気性細菌は、培養や遺伝子組換えの困難さから研究対象として敬遠されてきた。我々の研究室では、自然界から分離したオリジナルの *Clostridium* 属を対象に、バイオマス分解酵素や代謝経路について長年にわたり研究成果を蓄積してきた。これら菌株中で、セルロースに次いで多く存在するキチンを効率的に分解し水素ガスを高生産する *Clostridium paraputrificum* と、常温で生育して植物細胞壁成分を分解する *Ruminiclostridium josui* に着目した。生育条件が同じこれらを混合培養して、多様なバイオマスを常温で分解し、水素エネルギーやアルコールを回収できることは予備実験で実証している。しかし、工業的な視点からすれば生育速度と代謝産物の生産効率で改善の余地が大きい。この解決のため、嫌気性細菌特有の代謝経路を解明し、ゲノム編集技術を活用して自在に代謝を改変することを目指した。

嫌気性細菌は、遺伝子工学の基盤技術も十分ではなかったが、最近の研究によってゲノム編集や染色体への遺伝子組込みが可能になりつつある。我々は、研究室で保有する *C. paraputrificum* について Clostron 法 (Fig. 2) という遺伝子編集技術を活用して乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊によってピルビン酸から乳酸への流れを止め、アセチル CoA 以降へ代謝の流れを増やすことで水素ガスの生産に成功している。しかしながら、水素ガス生産のカギとなるピルビン酸からアセチル CoA への経路と、アセチル CoA から酪酸を生産する経路については未解明であった。そこで、これらに関与すると予測される遺伝子について、Clostron 法を利用して遺伝子破壊などを行い、水素ガスやアルコール生産の変化について調べる。また、セルロース分解菌 *R. josui* については Clostron 法の応用について確立していない。そこで、*R. josui* で外来遺伝子を高発現させるベクターの開発や、Clostron 法を可能とするための形質転換方法などの検討を実施した。

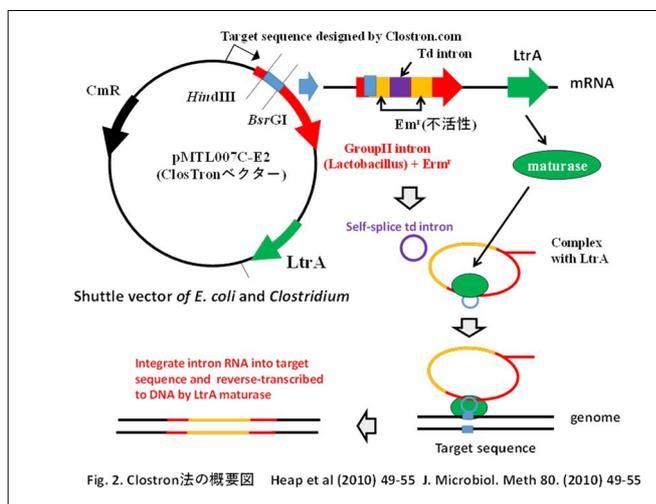


Fig. 2. Clostron法の概要図 Heap et al (2010) 49-55 J. Microbiol. Meth 80. (2010) 49-55

3. 研究の方法

(1) PFO 遺伝子の解析と Clostron ベクター作成及び PFO 遺伝子破壊

C. parapatrificum M-21 の全ゲノム解析結果から、他の *Clostridium* 属で PFO 遺伝子と報告されているアミノ酸配列と相同性をもつ遺伝子が 2 つ存在した (Fig. 3)。これらをそれぞれ PF01(1170aa), PF02(1172aa) と命名した。RNA-seq やリアルタイム PCR 法によって 2 つの遺伝子の発現量をしらべた。これらの遺伝子配列を英国 Nottingham 大学の Nigel Minton 教授のグループが開設している Clostron.com サイトにある GroupII イントロンターゲット配列検索アルゴリズムを使ったターゲット部位挿入配列を選択した。

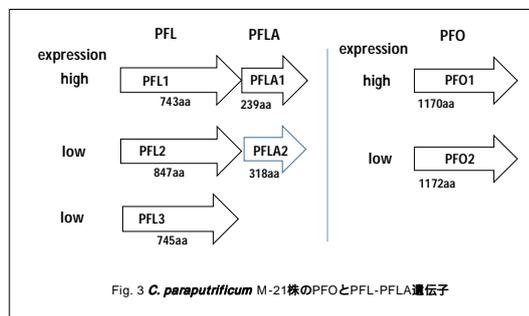


Fig. 3 *C. parapatrificum* M-21株のPFOとPFL-PFLA遺伝子

PCR 法によってターゲット配列を含む GroupII イントロン領域を増幅し、pMTL007C-E2 の *Hind*III と *Bsr*GI サイトへ断片を挿入した。完成したプラスミドを *C. parapatrificum* M-21 へ電気穿孔法で導入して、クロラムフェニコール耐性によりプラスミドが導入された細胞を選抜した (Fig. 2)。クロラムフェニコール耐性コロニーをエリスロマイシン耐性培地へ移植して生育してきたコロニーについて PCR 法によってイントロンが挿入されているか確認をおこなった。

(2) PFL 遺伝子の解析と Clostron ベクター作成

PFL 遺伝子をゲノム配列から検索したところ、*C. parapatrificum* M-21 株には 3 つの遺伝子が存在することが分かった (Fig. 3)。このうち、PFL1 については、活性化酵素遺伝子 (PFLA1) とタンデムにコードされていた。同様に PFL2 も PFLA2 とタンデムに存在していた。一方、PFL3 は単独で存在していた。通性嫌気性細菌の報告からは、PFL 酵素は不活性型として合成されたあと、PFLA によって活性化されて機能することが知られている。これらについて遺伝子発現を調べたところ、PFL1-PFLA1 が最も高発現をしており、PFL2-PFLA2 と PFL3 の発現は弱いことが分かった。これらの機能分担を解析するため、PFL と PFLA それぞれについて Clostron ベクターを作成して形質転換を行った。

(3) THL と HBD-CRT-BCD 遺伝子の解析と Clostron ベクター作成

アセチル CoA からアセトアセチル CoA を合成するチオラーゼ THL 遺伝子は染色体上に 1 つのみ存在し、発現解析ではピルビン酸以降の代謝系遺伝子の中で最も高発現していた。また、アセトアセチル CoA からブチリル CoA に至る代謝経路をコードする HBD-CRT-BCD はポリシストロニックにコードされていることが予測された。そこで、THL 遺伝子と HBD 遺伝子を破壊するための Clostron ベクターを作成した。

(4) 培養実験と代謝産物の解析

C. parapatrificum の培養は、100mL の嫌気瓶を用いた。嫌気瓶のブチルゴム栓に金属チューブを刺してタイゴン製のチューブで水上置換装置へガスを回収する方法で実施した。ガス生産が終了するのを待ってから、ガスと培養液を回収して分析を行った。ガス組成は TCD ガスクロを用いて解析した。アルコールは FID ガスクロを利用して分析し、有機酸は有機酸分析用 HPLC で定量した。

(5) *R. josui* 用の高発現ベクターと Clostron ベクターの構築

すでに研究室で開発した *R. josui* の形質転換に使用可能なベクター pKKM801 をベースとして、*C. parapatrificum* M-21 で高発現用のプロモーターとして解析済みのフェレドキシン遺伝子プロモーター Pfdx と、*R. josui* の骨格タンパク質遺伝子のプロモーター Pcip を大腸菌 GUS 遺伝子に連結したベクターを作成した (Fig. 4)。このプラスミドを形質転換して GUS 活性を測定した。

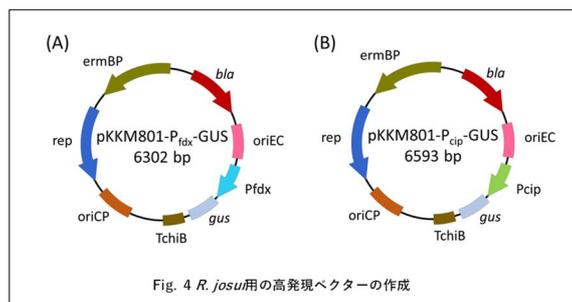


Fig. 4 *R. josui*用の高発現ベクターの作成

また、pKKM801 をベースとして Clostron ベクターを作成するため、pKKM801 のエリスロマイシン耐性遺伝子をクロラムフェニコール耐性に変更した pKKM801CAT を作成し、ここに pMTL007C-E2 由来のイントロン挿入部位を In-Fusion 法で連結した (Fig. 5)

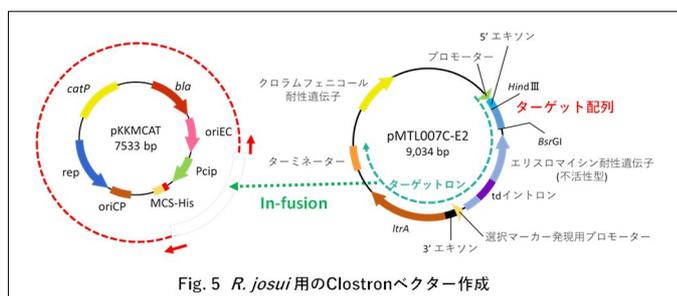


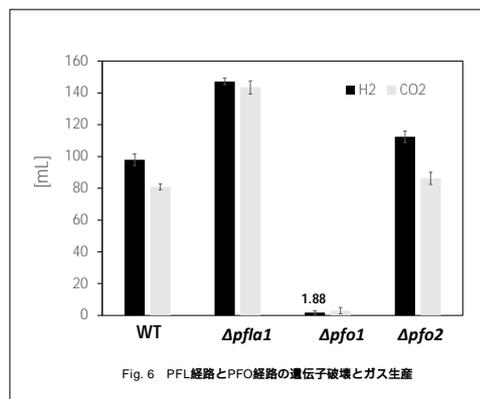
Fig. 5 *R. josui*用のClostronベクター作成

4. 研究成果

(1) PFO 遺伝子と PFL-PFLA 遺伝子の破壊

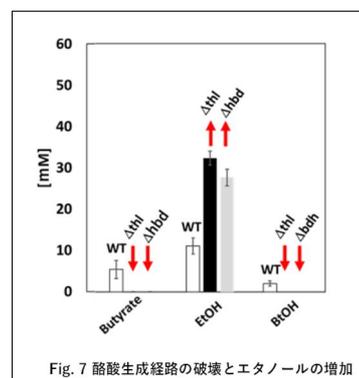
PF01 についてはすでに破壊株が偶然 1 株のみ得られていたため、再度破壊株の取得を試みたが得られなかった。このことは、PF01 が生育に必須であることを示唆している。また、得られた破壊株も生育が遅く、ガスを生産しないことから、この反応が水素ガス生産に重要な役割を果たしていることが推測された。一方、PF02 遺伝子の破壊株は得られたが、生育やガスの生産に野生株 (WT) と差は見られなかった (Fig. 6)。PF02 遺伝子は発現も弱いことから、この反応には PF01 が機能しており、PF02 はほとんど機能していない可能性が示唆された。

PFL - PFLA については、遺伝子破壊を試みた組み合わせのうち、PFLA1 のみ遺伝子破壊株が得られた。この破壊株を培養したところ、グルコースを炭素源とする培地で水素ガスの増加が観察された (Fig. 6)。このことから、PF0 と並列で働いている PFL の流れを弱めることで、代謝の流れが PF0 に多くなり、水素ガス生産が増加したものと予測された。一方で、PFLA1 以外の破壊株が取得できなかったことは、ギ酸を生産するこの反応が生育に重要な役割を果たしている可能性がある。PFL によって生じるギ酸は、C1 ユニットの供給源として利用されるという報告もあることから、*C. parautrificum* においても細胞内で必要な合成反応に利用されていることが推測された。一方、通性嫌気性細菌ではギ酸をさらに分解して水素ガス生産が起こることが報告されているが、*C. parautrificum* では PFLA1 破壊で水素ガスが増加したことから推測すると、ギ酸から水素ガスを生産する経路は存在しないか、機能が極めて弱いと推察される。



(2) THL と HBD-CRT-BCD 経路の破壊と代謝変化

C. parautrificum において、水素ガス生産以降の経路によって生産される成分のなかで、アルコールの生産はバイオエネルギーとして利用価値があるため注目される。ブタノールもわずかに生産されるが、エタノールの生産が殆んどである。ゲノム解析の結果からは、アセチル CoA からエタノールを生産する単一ポリペプチドのアルコール・アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH/ADH) が存在しており、この酵素がアルコール生産の本体であることはすでに確認している。そこで、酪酸生産の経路の出発点であるチオラーゼ THL 遺伝子と次のステップの HBD 遺伝子の破壊を試みたところ、どちらも破壊株が得られた。いずれの破壊株も酪酸とブタノールの生産がゼロとなり、アルコールの生産が増加したことからアセチル CoA が酪酸合成に流れずにアルコール生産に流れたためと考えられた (Fig. 7)。HBD 破壊株でもアルコールの生産が増加したのは、他の *Clostridium* で報告されているようにチオラーゼの反応が可逆的であるためと予測された。



(3) *R. josui* の高発現ベクターの構築と Clostron ベクター構築

R. josui はセルラーゼ遺伝子の巨大なクラスターを持っている。このクラスターにコードされる遺伝子のなかでも 5' 側の先頭にコードされる骨格タンパク質 Cip 遺伝子は、セルロソームという嫌気性細菌に多くみられるセルラーゼ巨大酵素複合体の骨格となるタンパク質をコードしており、特に高発現していることが予測される。そこで、この Cip 遺伝子上流に存在すると予測されるプロモーター Pcip を発現ベクター作成に利用するため、その強さを測るために大腸菌 GUS 遺伝子をレポーターとして連結した (Fig. 4)。また、比較対象として、*C. parautrificum* で高発現することが分かっているフェレドキシン遺伝子プロモーター Pfdx に GUS をレポーターとしたプラスミドを使って、*R. josui* に形質転換してセルロース培地で GUS 活性を測定した。その結果、Pcip よりも Pfdx の方が数倍高い GUS 活性を示した。Cip はセルロース存在下で高生産される可能性が高いため、形質転換体をセルロースを炭素源とする培地で培養したが、GUS 活性に大きな上昇は見られなかった。さらに、*R. josui* のセルラーゼ 48A 遺伝子をモデルとして Clostron ベクターを用いた遺伝子破壊実験を試みたが、プラスミドが導入された形質転換体を得られなかったことから、このプラスミド上の LtrA 遺伝子から生産される酵素が何らかの毒性を持っている可能性が考えられた。今後は形質転換後に抗生物質での選抜時間を短くするなど、

プラスミド保持の毒性を低下させる条件を探るなど、形質転換体選抜の方法を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南部秀斗、呉暁君、國武絵美、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌 <i>Clostridium paraputrificum</i> のacetyl-CoAから酪酸生成経路の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村しおり、竹内東沙、國武絵美、木村哲哉
2. 発表標題 <i>Clostridium paraputrificum</i> のピルビン酸ギ酸リアーゼ遺伝子の解析と水素ガス生産への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2022年度大会（京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南部秀斗、南川香奈江、國武絵美、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌 <i>Clostridium paraputrificum</i> の酸化還元電位をモニターするグローバル転写制御因子Rexの機能解析とバイオリファイナリーへの応用
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内東沙、西村しおり、國武絵美、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌 <i>Clostridium paraputrificum</i> のピルビン酸代謝経路の遺伝学的解析とバイオ水素ガス生産への応用
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野群士、瀬古樹、吳暁君、出口絵梨佳、國武給美、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌Clostridium paraputrificum M21のキチン分解酵素遺伝子群の機能解析と発現制御
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------